

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-068585

(43)Date of publication of application : 23.03.1993

(51)Int.Cl.

C12P 23/00  
// (C12P 23/00  
C12R 1:89 )

(21)Application number : 03-231965

(71)Applicant : HIGASHIMARU SHOYU KK

(22)Date of filing : 11.09.1991

(72)Inventor : FURUBAYASHI MAKIO  
ISHIKAWA HIROSHI  
KAKIZONO SHIYUNEI  
NAGAI SHIRO

### (54) PRODUCTION OF ASTAXANTHIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the subject substance having powerful antioxidizing action and high safety in a large amount by aerobically culturing a green alga *Hematococcus pluvialis* in the dark and then inducing cyst formation of the algae according to a specific method.

CONSTITUTION: *Hematococcus pluvialis* (preferably NIES144) is initially cultured under aerobic conditions in the dark to grow the *Hematococcus pluvialis* containing astaxanthin. An active oxygen-producing substance (preferably a substance such as  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  capable of producing iron ions) and a carbon source (preferably acetic acid) are added to the culture medium to carry out culture in the light. Thereby, cyst formation of the above-mentioned *Hematococcus pluvialis* is induced to promote the synthesis of the astaxanthin, which is finally collected from the culture.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 08.09.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3163127

[Date of registration] 23.02.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-68585

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 23/00		8828-4B		
// (C 1 2 P 23/00				
C 1 2 R 1:89)				

審査請求 未請求 請求項の数3(全 6 頁)

(21)出願番号	特願平3-231965	(71)出願人	000112048 ヒガシマル醤油株式会社 兵庫県龍野市龍野町富永100番地の3
(22)出願日	平成3年(1991)9月11日	(72)発明者	古林 万木夫 兵庫県龍野市揖西町田井164
		(72)発明者	石川 浩 兵庫県龍野市龍野町小宅北1-18
		(72)発明者	柿園 俊英 広島県東広島市西条町下三永354-151
		(72)発明者	永井 史郎 広島県広島市西区己斐本町3丁目1-6-1101
		(74)代理人	弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 アスタキサンチンの製造方法

(57)【要約】

【目的】 緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの培養方法を改善することによってアスタキサンチン含有量を早期に増加させ、効率よくアスタキサンチンを製造する方法、特にヘマトコッカス・プルビアリスを暗所で培養することを含むアスタキサンチンの製造方法を提供する。

【構成】 ヘマトコッカス・プルビアリスを暗所でかつ好氣的条件下で培養することにより、アスタキサンチンを含有するヘマトコッカス・プルビアリスを生育させた後、活性酸素生成物質と炭素源を培養基に添加して明所で培養し上記ヘマトコッカス・プルビアリスのシスト化を誘発し、アスタキサンチン合成を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する。得られたヘマトコッカス・プルビアリスをプロテアーゼ処理し、かつ細胞壁に浸透圧ショックを加えることにより細胞が破壊され、アスタキサンチンが採取される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ヘマトコッカス・プルビアリスを暗所でかつ好氣的条件下で培養することにより、アスタキサンチンを含有するヘマトコッカス・プルビアリスを生育させた後、活性酸素生成物質と炭素源を培養基に添加して明所で培養し該ヘマトコッカス・プルビアリスのシスト化を誘発してアスタキサンチン合成を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法。

【請求項2】前記活性酸素生成物質が鉄イオンである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】ヘマトコッカス・プルビアリスをプロテアーゼ処理し、かつ細胞壁に浸透圧ショックを加える工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスから大量に効率よくアスタキサンチンを得る、アスタキサンチンの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】アスタキサンチンは、甲殻類の殻や卵、サケの肉、キンメダイの表皮など、動物界にきわめて広く分布している赤色カロチノイドの一種である。ファフィア・ロドチーマのようなアスタキサンチンを含む赤色酵母の菌体を養殖マスの発色飼料として、近年では、養殖マダイの発色飼料として、南極オキアミなどに代替させる用途が検討されている。また、アスタキサンチンの持つ強力な抗酸化作用により、医薬活性成分としての用途も検討されている。

【0003】緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスもアスタキサンチンを含有するが、効率よくアスタキサンチン含有量を増加させるための詳細な培養条件および細胞から効率よくアスタキサンチンを得る方法についてはよく知られていない。一般に緑藻類は、光合成によりエネルギーを得るため明所で培養しなければ増殖せず、さらに発色もしないと考えられてきた。ヘマトコッカス・プルビアリスも従来、炭酸ガスあるいは酢酸を炭素源として明所で培養されている。培養時に光が必要であることから、大量生産が困難であるという欠点があった。そのため、光効率を高めるために光バイオリアクターを用いた培養法も検討されている。また、緑藻ドナリエラやラン藻スピリリナなどの培養では、太陽光を利用して屋外池や海洋で実施されているが、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの場合、生育最適温度が低いため、高温となる屋外での培養ができないという欠点を有している。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの培養方法を改善することによってアスタキサンチン含有量を早期に増加させ、効率よくアスタキサンチンを製造する方法、特にヘマトコッカ

ス・プルビアリスを暗所で培養することを含むアスタキサンチンの製造方法を提供することを目標としている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスによるアスタキサンチンの生産方法について検討を重ねた結果、ヘマトコッカス・プルビアリスを暗所でかつ好氣的条件下で培養することが可能であり、このとき細胞分裂を伴う栄養増殖細胞中に増殖連動でアスタキサンチンが蓄積されることを見いだした。さらに、この暗所で培養した培養基に活性酸素生成物質と炭素源を添加して明所に移すことによりシスト化が誘発されアスタキサンチン合成が促進されること、その場合、シスト化誘発の前に上記のように暗所で培養していても、明所で培養していたのと同等のアスタキサンチン合成が得られることも見いだした。これらの知見に基づいて本発明を成すに至った。

【0006】本発明は、ヘマトコッカス・プルビアリスを暗所でかつ好氣的条件下で培養することにより、アスタキサンチンを含有するヘマトコッカス・プルビアリスを生育させた後、活性酸素生成物質と炭素源を培養基に添加して明所で培養し該ヘマトコッカス・プルビアリスのシスト化を誘発してアスタキサンチン合成を促進させ、該培養物からアスタキサンチンを採取する工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法を提供する。

【0007】本発明はさらに、ヘマトコッカス・プルビアリスをプロテアーゼ処理し、かつ細胞壁に浸透圧ショックを加える工程を包含する、アスタキサンチンの製造方法を提供する。

【0008】本発明に用いる緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、単細胞で細胞の大きさは20～25μmであり、淡水に生息するプランクトンであって、容易に採取することができる。例えばHaematococcus pluvialis ASIB BS2, CALU 9, CALU 333, CAUP G1002, CCAO, IBAS U 38, IPPAS H-23, MUR 01, 02, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 75, 76, 77, NIES 144, NIVA CHL 9, SMBAがある。Haematococcus lacustrisの中にはヘマトコッカス・プルビアリスと同一のものもあり、このような同一のものとしてATCC 30402, SAG 34-1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1h, 1k, 1l, 1m, 1n, UTEX 16がある。本発明に好適に用いられるヘマトコッカス・プルビアリスは国立環境研(NIES)に寄託番号NIES 144として寄託されている。

【0009】緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスの栄養細胞は、通常、2本の鞭毛をもつ浮遊細胞として存在し、緑藻クラミドモナスと同様に親細胞の壁内で分裂して増殖する。栄養細胞の周りには、ゼラチン状の細胞壁をもつ。栄養細胞は、窒素源が欠乏した培養基に移すことによりゼラチン質の内側に厚い強固な細胞壁を発達させ、やがて細胞は遊泳を停止して、無性的に、硬い細胞壁を有しアスタキサンチンを大量に含有するシストを形

成する。

【0010】ヘマトコッカス・プルビアリスの暗所でかつ好氣的条件下での培養は、以下の条件下で行う。緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、自然界においては、炭酸ガスと光エネルギーで生育する光合成生物であるため、暗所でかつ好氣的条件下で培養させるためには、炭酸ガスに代替し得る炭素源を従属栄養として十分な量含む培地を用いる必要がある。炭素源としては、例えば、従来から知られている酢酸のほか、ピルビン酸、エタノール、およびTCA関連有機酸等がある。TCA関連有機酸としては、例えばクエン酸、 $\alpha$ ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸等がある。上記の各々の炭素源と、アスパラギン、グリシン、グルタミン等のアミノ酸のような窒素源とを含む群の中から選ばれる1種または2種以上に、更に酵母エキスを組み合わせた培地が用いられる。酵母エキスは必須であるが、グリシン、グルタミン等のアミノ酸を用いた場合は、酵母エキスを省いても、酵母エキスを加えたときと同程度のヘマトコッカス・プルビアリスの生育が見られる。好ましい培地は、例えば酵母エキス2.0g/l、酢酸ナトリウム1.2g/l、L-アスパラギン0.4g/l、 $MgCl_2 \cdot 7H_2O$  985 $\mu$ M、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  36 $\mu$ M、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  136 $\mu$ M、pH6.8である。培養条件としては、暗所でかつ好氣的条件下、温度は15~25℃であり、好ましくは20℃前後である。

【0011】このようにして培養したヘマトコッカス・プルビアリスは、暗所であるにもかかわらず、細胞分裂を伴う栄養細胞内に、増殖期の早い時期からアスタキサンチンの蓄積が見られる。細胞当りのアスタキサンチン含有量は、同一条件下での明所での培養と変わらない。

【0012】この栄養細胞中のアスタキサンチンを採取することも可能であるが、人為的に培養基中の成分組成を適当に調節することにより、栄養細胞からシストへの形態変化を誘導して、アスタキサンチン生産機能を最大限に引き出すのが有利である。それには、活性酸素生成物質と炭素源を、培養途中で比較的高濃度に添加して、形態変化を誘導する。活性酸素生成物質と炭素源を添加したら、暗所から明所に移行して培養を行う。用いられる活性酸素生成物質には、例えば、鉄イオンを生じ得る物質、メチレンブルー、メチルビオロゲン、過酸化水素( $H_2O_2$ )、2, 2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ジヒドロクロリドがある。特に鉄イオンを生じ得る化合物が好ましい。形成される鉄イオンは、二価または三価であり、このような鉄イオンを形成し得る化合物としては、例えば $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 、 $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ が挙げられる。活性酸素生成物質の添加量は、その物質の種類により異なるが、例えば培養基中の鉄イオンの濃度は、シスト化誘導前の培養基に用いられる量の数倍以上、最大600 $\mu$ Mまで、好ましくは450 $\mu$ Mとな

るように添加される。上記のように、鉄イオンは活性酸素を生成するためにアスタキサンチン合成を促進すると考えられる。様々な酸化的ストレスから細胞を防御するために、ヘマトコッカス・プルビアリスの細胞内において強力な抗酸化作用を有するアスタキサンチンを合成すると考えられる。

【0013】使用される炭素源としては、上記のものが何れも用いられ、好ましくは酢酸を使用する。酢酸濃度が最大60mMまで、好ましくは45mMとなるように培養基に添加する。上記を越える濃度での使用は、逆にアスタキサンチン生産を抑制し好ましくない。炭素源のみでもシスト化が誘導され、アスタキサンチン生産が増大するが、鉄イオンを炭素源と同時に添加するとアスタキサンチン生産はさらに増大する。

【0014】上記2段階の培養方法は、アスタキサンチン合成の期間を速く短くして、初期から作らせることができる。増殖期に暗所でよいので、増殖による光の当り具合の変化を考慮する事なく、通常の発酵槽で発酵可能であるので培養が容易である。

【0015】収穫された緑藻ヘマトコッカス・プルビアリスは、浸透圧調節剤のない反応液中でプロテアーゼ処理することにより、細胞を完全に破壊することができる。従来高等植物や多くの藻類の細胞プロトプラスト調製のために用いられている細胞壁分解酵素には、大別すると、セルロース成分を分解する酵素類(セルラーゼ、ヘミセルラーゼ)と、ペクチン質(ペクチナーゼ)を分解するものがある。ヘマトコッカスの細胞壁についても、上記2つの成分を合わせ持つ細胞壁溶解酵素(ドリラーゼ)を用いた報告があるが、十分に破碎された藻体破碎物が得られない。ヘマトコッカスの細胞壁は、構成成分としてセルロース、ヘミセルロース、ペクチン、リグニンを欠き、糖タンパク質のみからなる点で、高等植物や他の藻類と大きく異なる。このため、糖タンパク質の糖ではなくタンパク質に注目してプロテアーゼを細胞壁の破壊に使用することにより、効果的に細胞壁を溶解することができる。ヘマトコッカス・プルビアリスに、浸透圧調節剤存在下でプロテアーゼを作用させるとプロトプラスト細胞を得、浸透圧調節剤の無い反応液中でプロテアーゼ処理することにより浸透圧ショックを加えると、細胞は完全に破壊される。プロテアーゼは、由来の異なる各種プロテアーゼ、プロナーゼE、プロテイナーゼKが使用可能であり、反応条件はpH中性付近で、室温(20-40℃)、好ましくは35℃前後、酵素濃度は0.1%で、30分から2時間反応させる。

【0016】ヘマトコッカス・プルビアリス細胞の破碎には、他のガラスビーズを加えグライディングにより破碎する方法あるいはフレンチプレスを用いる方法、さらには超音波破碎法などの既知の物理的方法を適用し、メタノールあるいはアセトンなどの極性の大きい溶媒で抽出することにより回収することができる。また、細胞を

バルクのままで魚の色出し等に使用することもできる。アスタキサンチンの精製は、既知の分離精製手段を適宜利用することによって所望の純度のアスタキサンチンを得ることができる。

【0017】上記プロテアーゼを用いる細胞の破壊方法は、ヘマトコッカス・プルビアリスからのアスタキサンチンの採取に使用されるのみならず、糖タンパク質を細胞壁成分として含有する様々な藻類微生物の細胞の細胞壁の破壊にも好適に利用され得る。

【0018】

【実施例】次に酢酸を炭素源とした実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】実施例1

表1に示す培養基100mlを200ml容のフラスコに入れ、121℃で、15分間滅菌した。維持用の培養基に別に培養したヘマトコッカス・プルビアリス (*Haematococcus pluvialis* NIES 144)のシードを接種し、暗所下および明所下、たとえば1500ルクスの光照度下、12時間明暗周期で20℃で4日間培養し、予備培養を行った。

【0020】この培養液10mlずつを上と同組成の培養基100mlに接種し、それぞれ暗所下または明所下で、20℃で8日間本培養した。

【0021】本培養時における暗所下または明所下での、ヘマトコッカス・プルビアリスの栄養体細胞の増殖および生産されるカロチノイドの量の変化を図1に示す。カロチノイド量は480nmでの吸光度から測定した後、抽出し、その約90%がアスタキサンチンであることを確認した。

【0022】ヘマトコッカス・プルビアリスは暗所下で、酢酸を炭素源として確実に増殖した。また、表1に示す培養基から、酵母エキスを除くとヘマトコッカス・プルビアリスの生育は悪くなるが、グリシン、グルタミン等のアミノ酸を加えることにより生育は同程度まで回復し、酵母エキスの代替をし得ることができた。炭素源濃度としては、45mMまでが至適範囲である。暗所下で得られたヘマトコッカス・プルビアリスは細胞当たり明所下の場合と同程度、色素であるクロロフィルおよびカロチノイドを含有していた。色素は増殖と共に細胞内に蓄積され、含有量はクロロフィル10~20mg/g乾燥重量、カロチノイド10mg/g乾燥重量であった。

【0023】

【表1】

酵母エキス	2.0 g/l
酢酸ナトリウム	1.2 g/l
L-アスパラギン	0.4 g/l
MgCl <sub>2</sub> ・7H <sub>2</sub> O	984 μM
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	36 μM
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	136 μM
pH	6.8

【0024】実施例2

実施例1と同様にして、4日間培養後、炭素源として酢酸濃度が45mM、鉄イオン濃度(FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O)が450μMとなるように添加し、9000ルクスの24時間連続光照射下、20℃で更に4日間培養した。鉄イオンは三価を用いてもよい。アスタキサンチン量は実施例1と同様にして測定した。ヘマトコッカス・プルビアリスの栄養細胞は、炭素源である酢酸と鉄イオンを添加後、シストの形成を開始し、細胞内にアスタキサンチンを大量に蓄積した(図2)。同時に、生成していたクロロフィルの急激な分解も起こっている。

【0025】このように、暗所下または明所下で4日間培養したヘマトコッカス・プルビアリスの栄養細胞に、炭素源として酢酸と鉄イオンを添加することにより、アスタキサンチンを大量に細胞内に蓄積させることができた。8日間の培養で、20mg/lを越える高濃度のカロチノイド(そのうちアスタキサンチン含有量は約90%)を得ることができた。

【0026】実施例3

増殖期のヘマトコッカス・プルビアリスの栄養細胞に浸透圧調整剤(ソルビトール/マンニトール)を含む反応液中で、下記のようにプロテアーゼ処理をすると、約1時間でプロトプラスト細胞が50%得られた。浸透圧調整剤のない反応液中でプロテアーゼ処理すると、細胞は完全に破壊した。使用したプロテアーゼは、プロナーゼE(0.15%)およびプロテイナーゼK(0.1%);反応液は、ソルビトール/マンニトール0.2M、トリエタノールアミン緩衝液10mM、pH7.5;反応条件は35℃で1時間であった。

【0027】

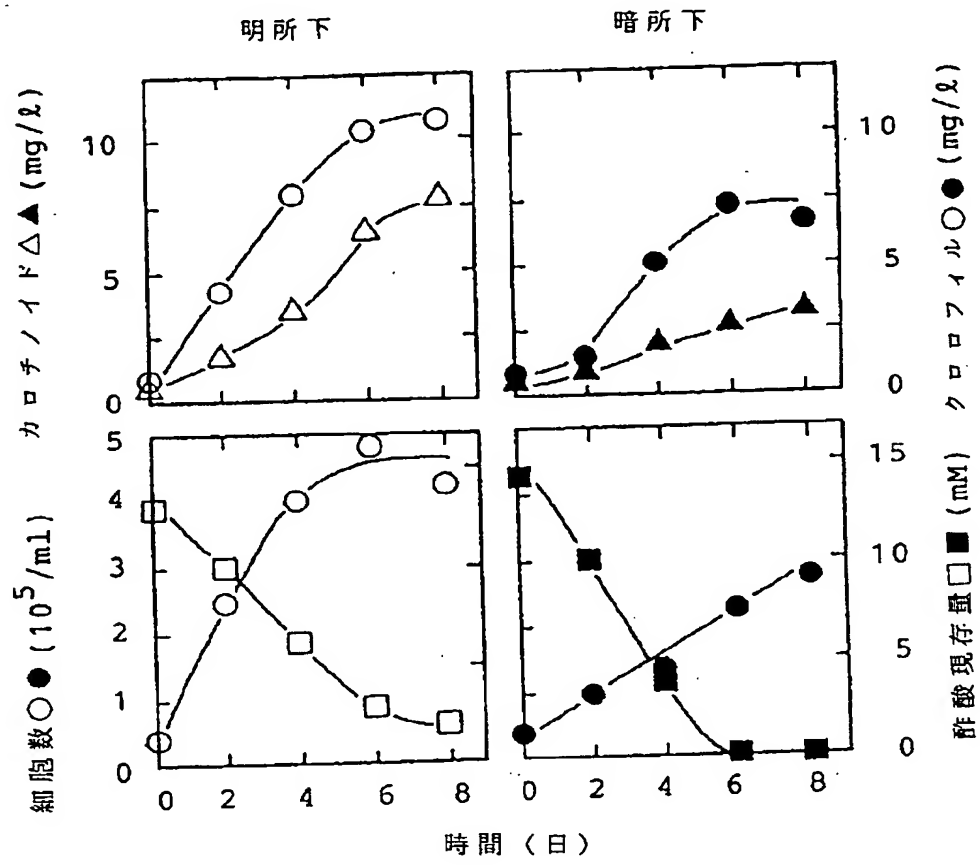
【発明の効果】本発明によれば、藻中にアスタキサンチンが早期から蓄積し、さらに人工的なシスト誘導により効率よくアスタキサンチンを合成させることができる。アスタキサンチンを大量に効率よく製造する製造方法が提供される。得られるアスタキサンチンは安全性が高いので、魚類養殖その他の産業に寄与し得る。

【図面の簡単な説明】

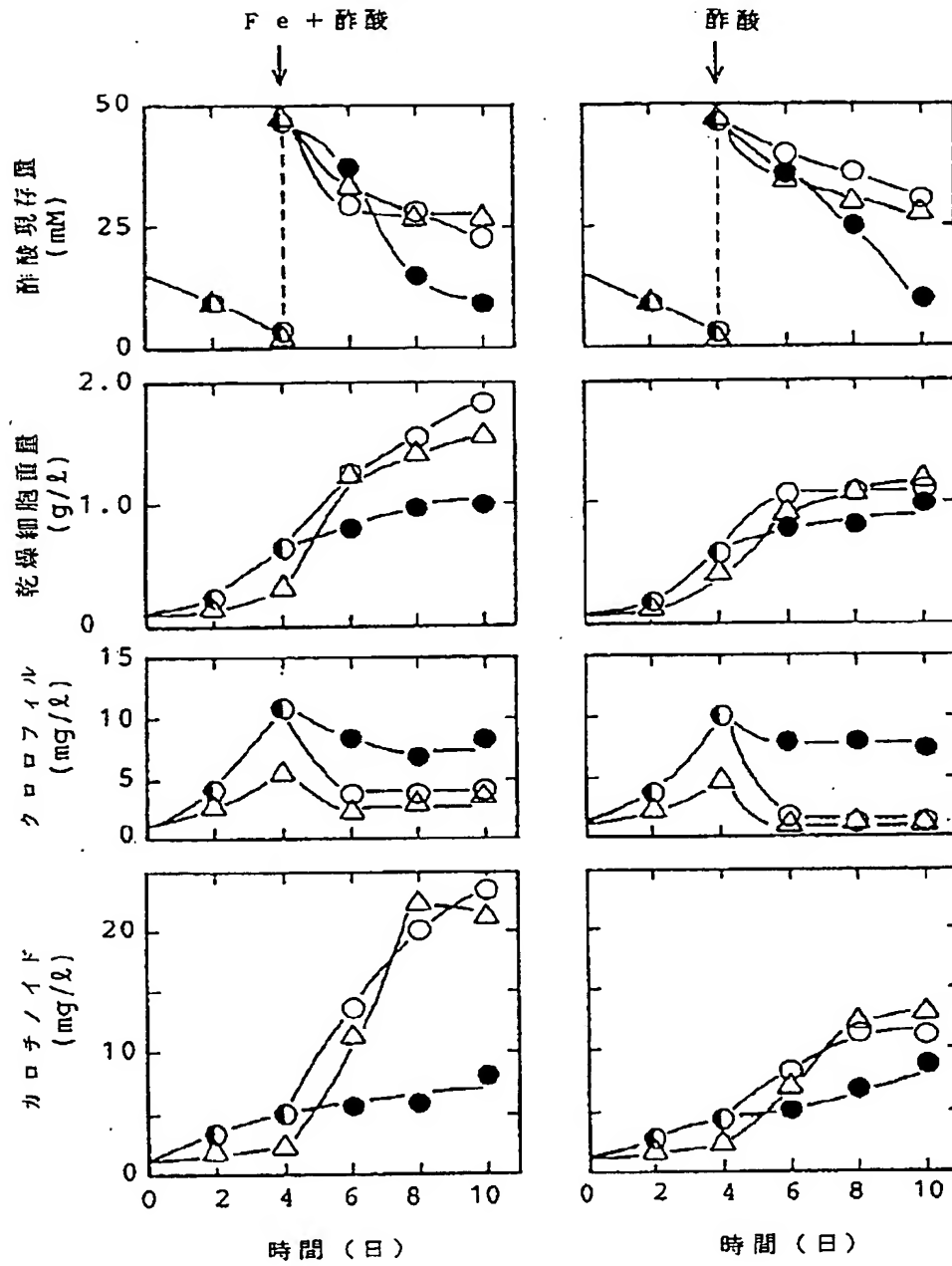
【図1】ヘマトコッカス・プルビアリス栄養体細胞の増殖とカロチノイドの生成を示す。

【図2】ヘマトコッカス・プルビアリスの増殖とカロチノイド生成に対する鉄イオンおよび酢酸添加の効果を示す。

【図1】



【図2】



○: 明所 (1500 lx, 12時間/12時間) → 明所 (9000 lx, 24時間)  
 ●: 明所 ( 同上 ) → 暗 所  
 △: 暗 所 → 明所 (9000 lx, 24時間)